

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 30 19 614 A 1**

⑤ Int. Cl. 3:
C 08 B 37/00

⑳ Aktenzeichen: P 30 19 614.6
㉑ Anmeldetag: 22. 5. 80
㉒ Offenlegungstag: 3. 12. 81

㉓ Anmelder:
Sankyo Co., Ltd., Tokyo, JP

㉔ Erfinder:
Matsueda, Rei, Tokyo, JP; Iizuka, Yoshio, Chofu, Tokyo, JP;
Shinkai, Kenkichi, Sagamihara, Kanagawa, JP

㉕ Vertreter:
von Föner, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Strehl, P., Dipl.-Ing.
Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Schübel-Hopf, U., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Ebbinghaus, D., Dipl.-Ing.; Finck, K., Dipl.-Ing.
Dr.-Ing., Pat.-Anw., 8000 München

㉖ **Hydrolysiertes Polysaccharid**

DE 30 19 614 A 1

DE 30 19 614 A 1

BEST AVAILABLE COPY

BUNESDRUCKEREI BERLIN 10. 81 130 049/102

9.70

PATENTANWÄLTE
SCHIFF v. FÜNER STREHL SCHÜBEL-HOPF EBBINGHAUS FINCK

MARIAHILFPLATZ 2 & 3, MÜNCHEN 90
POSTADRESSE: POSTFACH 95 0160, D-8000 MÜNCHEN 95

3019614

ALSO PROFESSIONAL REPRESENTATIVES
BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

KARL LUDWIG SCHIFF (1964 - 1978)
DIPL. CHEM. DR. ALEXANDER v. FÜNER
DIPL. ING. PETER STREHL
DIPL. CHEM. DR. URSULA SCHÜBEL-HOPF
DIPL. ING. DIETER EBBINGHAUS
DR. ING. DIETER FINCK

TELEFON (089) 48 20 54
TELEX 5-23686 AURO D
TELEGRAMME AUROMARCPAT MÜNCHEN

SANKYO COMPANY, LIMITED

DEA - 13 404

22. Mai 1980

Hydrolysiertes Polysaccharid

PATENTANSPRÜCHE
=====

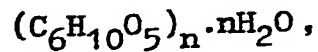
① Hydrolysiertes Glucan mit β -(1 \rightarrow 3)-Bindungen in der Hauptkette und β -(1 \rightarrow 6)-Bindungen in den Seitenketten, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verhältnis von Glucoseeinheiten in den Seitenketten zu Glucoseeinheiten in der Hauptkette von etwa 2:7 hat und folgende Eigenschaften aufweist:

- (a) In Form des gefriergetrockneten Produkts ist es ein weißer, amorpher Feststoff;
- (b) es ist löslich in Wasser, Dimethylsulfoxid und in Dimethylformamid und ist unlöslich in Äthanol, Aceton, Äthylacetat, Benzol und Diäthyläther;

130049/0102

BEST AVAILABLE COPY

- (c) seine Elementaranalyse entspricht im wesentlichen den Werten, die für ein Polysaccharid des Hexosid-Typs mit gebundenem Wasser der folgenden Formel errechnet werden:



in der n eine aus Eigenschaft (e) errechnete Zahl von mehr als 800 ist;

- (d) sein Infrarot-Spektrum (KBr-Pulver) entspricht dem in der beigegeführten Zeichnung dargestellten Spektrum und
- (e) in der analytischen Ultrazentrifugal-Verteilungskurve wird nur ein einziger Peak beobachtet und sein aus der Sedimentationskonstante errechnetes Molekulargewicht beträgt 150 000 bis 160 000;

wobei das Glucan durch Behandeln eines Polysaccharids, das durch einen Fungus der Familie Corticiaceae erzeugt wird, mit Ameisensäure und Hydrolyse des so behandelten Produkts erhältlich ist.

2. Verfahren zur Herstellung eines hydrolysierten Glucans, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Polysaccharid, das durch einen Fungus der Familie Corticiaceae erzeugt wird, mit Ameisensäure behandelt und das so behandelte Produkt dann hydrolysiert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Behandlung mit einer 70 bis 90 gewichts-

130049/0102

prozentigen wässrigen Ameisensäure durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß man das Polysaccharid mit der Ameisen-
säure bei einer Temperatur von 80° bis 100°C umsetzt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß man die Hydrolyse durch
Erhitzen eines Gemisches aus dem Behandlungsprodukt mit Ameisen-
säure und Wasser unter Rückfluß durchführt, bis die Deformylie-
rung vervollständigt ist.

6. Arzneimittel mit immunmodulierender Aktivität, welches einen
Immunmodulator im Gemisch mit einem pharmazeutisch geeigneten
Träger oder Verdünnungsmittel enthält, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß es als Immunmodulator ein hydrolysier-
tes Glucan gemäß Anspruch 1 aufweist.

7. Arzneimittel nach Anspruch 6, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß es in Form eines Präparates zur par-
enteralen Verabreichung zubereitet ist.

130049/0102

BESCHREIBUNG

=====

Die Erfindung betrifft ein neues hydrolysiertes Glucan, ein Verfahren zu seiner Herstellung und für pharmazeutische Zwecke geeignete Zubereitungen, die dieses hydrolysierte Glucan enthalten. Das erfindungsgemäße Glucan ist ein wertvolles immunmodulierendes Mittel zur Behandlung von Krebserkrankungen und von Gelenkrheumatismus.

Es ist gut bekannt, daß Fungi der Klasse Basidiomycetes Polysaccharide erzeugen können, die Aktivität gegen Krebsarten und andere Tumoren besitzen. Diese Polysaccharide sind jedoch nur geringfügig in Wasser löslich und selbst wenn es möglich ist, eine wässrige Lösung aus solchen Polysacchariden herzustellen, gelatiniert diese Lösung leicht. Infolgedessen ist es sehr schwierig, pharmacologische Versuche mit diesen Polysacchariden durchzuführen und noch stärkere Schwierigkeiten treten auf, wenn man versucht, diese Polysaccharide therapeutisch anzuwenden.

Gelenkrheumatismus ist eine unheilbare Krankheit und obwohl zahlreiche Arzneimittel untersucht worden sind, um die Krankheit zu heilen, waren die Versuche nicht erfolgreich. Bekannte Behandlungen, beispielsweise die Behandlung mit Steroiden, steroidfreien entzündungshemmenden Mitteln, goldhaltigen Arzneimitteln usw., sind in jedem Fall symptomatische Behandlungen, jedoch keine kausalen Behandlungen.

In der japanischen Patentschrift 828 248 wird ein Verfahren zur Herstellung eines Polysaccharids mit Anti-Tumor-Aktivität beschrieben, bei dem ein Glucan erzeugender Mikroorganismus des Genus Corticium oder des Genus Hypnochus gezüchtet wird und danach aus der Kulturbrühe ein Glucan abgetrennt wird, welches in

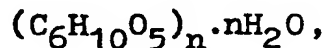
130049/0102

der Hauptkette β -(1 \rightarrow 3)-Bindungen und in den Seitenketten β -(1 \rightarrow 6)-Bindungen besitzt. Wie jedoch vorstehend erläutert wurde, hat das gebildete Glucan zwar Antitumoraktivität, es läßt sich jedoch in der Praxis schwierig anwenden, weil seine wässrige Lösung zur Gelbildung neigt.

Erfindungsgemäß wurde nun überraschenderweise gefunden, daß durch Behandlung von Glucanen dieses Typs mit Ameisensäure und anschließende Hydrolyse des gebildeten Produkts ein Glucan mit wesentlich verbesserter Löslichkeit in Wasser hergestellt werden kann und daß darüber hinaus das so erhaltene Glucan in unerwarteter Weise eine sehr stark verbesserte Antitumoraktivität zeigt.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Glucan, das β -(1 \rightarrow 3)-Bindungen in der Hauptkette und β -(1 \rightarrow 6)-Bindungen in den Seitenketten aufweist, wobei das Verhältnis von Glucoseeinheiten in den Seitenketten zu Glucoseeinheiten in der Hauptkette etwa 2:7 beträgt, welches durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet ist:

- (a) In Form des gefriergetrockneten Produkts ist es ein weißer, amorpher Feststoff;
- (b) es ist löslich in Wasser, Dimethylsulfoxid und in Dimethylformamid und ist unlöslich in Äthanol, Aceton, Äthylacetat, Benzol und Diäthyläther;
- (c) seine Elementaranalyse entspricht im wesentlichen den Werten, die für ein Polysaccharid des Hexose-Typs mit gebundenem Wasser der folgenden Formel errechnet werden:



in der n eine aus Eigenschaft (e) errechnete Zahl von mehr als 800 ist;

- (d) sein Infrarot-Spektrum (KBr-Pulver) entspricht dem in der beigegeführten Zeichnung dargestellten Spektrum und

130049/0102

(e) in der analytischen Ultrazentrifugal-Verteilungskurve wird nur ein einziger Peak beobachtet und sein aus der Sedimentationskonstante errechnetes Molekulargewicht beträgt 150 000 bis 160 000.

Dieses Glucan ist erhältlich durch Behandlung eines Polysaccharids, das durch einen Fungus der Familie Corticiaceae erzeugt wird, mit Ameisensäure und Hydrolyse des so behandelten Produkts.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen hydrolysierten Glucans durch Behandlung eines Polysaccharids, das durch einen Fungus der Familie Corticiaceae gebildet wird, mit Ameisensäure und anschließende Hydrolyse des so behandelten Produkts.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein Arzneimittel, welches das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan im Gemisch mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel enthält.

Das als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren verwendete Polysaccharid ist ein Stoffwechselprodukt eines Fungus der Familie Corticiaceae der Basidiomyceten, beispielsweise eines Fungus des Genus Corticium oder Hypnochos. Dieses Ausgangs-Polysaccharid kann hergestellt werden, indem der gewählte Fungus gezüchtet wird, wie ausführlicher in der japanischen Patentschrift 828 248 beschrieben ist.

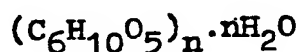
Das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan wird vorzugsweise hergestellt, indem 70 bis 90-gewichtsprozentige wässrige Ameisensäure zu dem Ausgangs-Polysaccharid gegeben wird und das erhaltene Gemisch, vorzugsweise unter Rühren, erhitzt wird. Die Temperatur, auf die das Reaktionsgemisch erhitzt wird, ist nicht besonders kritisch, wenn auch eine Temperatur von 80° bis 100°C bevorzugt wird. Die für diese Reaktion erforderliche Zeit hängt von den Reaktionsbedingungen, insbesondere der Temperatur, ab; die Reaktion läuft jedoch normalerweise innerhalb einer Dauer von 5 Minuten bis 1 Stunde vollständig ab.

130049/0102

Vorzugsweise wird danach der Überschuß an Ameisensäure durch Verdampfen unter vermindertem Druck entfernt. Dann wird Wasser zugesetzt, um den Rückstand zu hydrolysieren. Die Hydrolyse erfolgt vorzugsweise durch Erhitzen des Gemisches unter Rückfluß, bis die Deformylierung vollständig ist. Das gebildete gelatinöse Material kann dann durch Zentrifugieren entfernt werden und zu der Mutterlauge wird ein organisches Lösungsmittel zugesetzt, um einen Niederschlag auszufällen, der dann gewonnen wird. Die Art des in dieser Stufe verwendeten Lösungsmittels unterliegt keiner speziellen Beschränkung, vorausgesetzt, daß dieses das hydrolysierte Polysaccharid nicht löst. Vorzugsweise wird ein Alkohol, wie Methanol oder Äthanol, verwendet. Der erhaltene Niederschlag wird dann in Wasser gelöst oder dispergiert und die Lösung oder Dispersion wird gefriergetrocknet, wobei das gewünschte hydrolysierte Polysaccharid in Form eines weißen, amorphen Feststoffes erhalten wird.

Dieser amorphe Feststoff ist in Wasser, Dimethylsulfoxid und in Dimethylformamid löslich und ist unlöslich in Äthanol, Aceton, Äthylacetat, Benzol und Diäthyläther. Er ist außerdem wärmebeständig.

Die Daten seiner Elementaranalyse entsprechen den Daten, die für ein Polysaccharid des Hexosid-Typs mit einem Gehalt an gebundenem Wasser der Formel



errechnet werden.

Das Infrarotspektrum des Produkts (in Kaliumbromid-Pulver) ist in Fig. 1 dargestellt.

Die Verbindung hat eine spezifische Drehung

$$[\alpha]_D^{20} = -15^\circ \pm 5^\circ \quad (c = 0,1, \text{ Dimethylsulfoxid}).$$

In der analytischen Ultrazentrifugal-Verteilung (ultra-centrifugal spectrum) des Produkts wurde nur ein einziger Peak beob-

130049/0102

achtet und aus der Sedimentationskonstante wurde ein Molekulargewicht im Bereich von 150 000 bis 160 000 erhalten, woraus der Wert n in der vorstehend angegebenen Formel zu 833 bis 889 errechnet werden konnte.

Die das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan aufbauenden Saccharide können in folgender Weise identifiziert werden. Das hydrolysierte Glucan wird in 1n wässriger Schwefelsäure gelöst und dann während 120 Minuten bei 100°C in einem geschlossenen Rohr weiter hydrolysiert. Dann wird das Produkt mit Bariumhydroxid neutralisiert und der Papierchromatographie unterworfen. Durch Entwicklung des Papierchromatogramms mit einer wässrig-ammoniakalischen Silbernitratlösung wird nur ein einziger Flecken beobachtet. Das durch diesen einzigen Flecken charakterisierte Produkt kann durch Vergleich mit der Wiederholung des Versuches unter Verwendung einer Standardprobe als Glucose identifiziert werden. Die Bindungsarten der Glucoseeinheiten, die das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan aufbauen, können bestimmt werden, indem das Glucan mit Hilfe üblicher Methoden vollständig methyliert wird, das methylierte Glucan unter Bildung von methylierter Glucose hydrolysiert und die methylierte Glucose reduziert und das Reduktionsprodukt acetyliert wird. Durch Gaschromatographie wird das so gebildete Gemisch als Acetate von 2,3-, 4,6-Tetra-O-methylglycitol, 2,4,6-Tri-O-methylglycitol und 2,4-Di-O-methylglycitol im Molverhältnis von etwa 1:2,5:1 identifiziert. Dieses Ergebnis bestätigt, daß das erfindungsgemäße Glucan etwa zwei Seitenketten (jeweils aus einer einzigen Glucoseeinheit), gebunden mit (1 → 6)-Bindungen auf je 7 Glucoseeinheiten, mit (1 → 3)-Bindungen, in der Glucan-Hauptkette aufweist.

Durch Untersuchung der Zersetzungsprodukte, die mit Hilfe von Endo-β-1,3-glucanase und Exo-β-1,3-glucanase erhalten wurden, wurde außerdem bestätigt, daß alle Glucosebindungen in der β-Konfiguration vorlagen.

Das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan ist besser in Wasser löslich und unterliegt weniger stark der Gelbildung in wässriger

130049/0102

Lösung, als das Polysaccharid, aus dem es hergestellt wurde.

Außerdem ist seine immunmodulierende Aktivität (beispielsweise die Anti-Krebs-Aktivität und die Hemmwirkung gegen Arthritis) sehr stark und von niedriger Toxizität begleitet. Insbesondere die starke Aktivität zur Hemmung von Arthritis und die niedrige Toxizität waren angesichts der entsprechenden Eigenschaften bzw. Aktivitäten von Polysacchariden, die direkt durch Fungi der Klasse Basidiomycetes erzeugt wurden, nicht zu erwarten. Das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan ist daher wertvoll zur Behandlung von Krankheiten, die durch Störungen des Immunsystems verursacht werden, z.B. Gelenkrheumatismus.

Die biologische Aktivität und Toxizität des erfindungsgemäßen hydrolysierten Glucans werden durch die nachstehenden Tests aufgezeigt.

(1) Anti-neoplastische Aktivität

Diese Versuche wurden mit 7 Wochen alten männlichen Mäusen des ICR-Stammes durchgeführt. 2×10^6 Krebszellen von Sarcoma 180 wurden auf die Achselhaut jeder Maus aufgepfropft. 6 bzw. 7 Tage nach dem Aufpfropfen wurde eine Probe des erfindungsgemäßen hydrolysierten Glucans (hergestellt nach der in dem nachstehenden Beispiel 1 beschriebenen Weise) in sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung durch Injektion in die Bauchhöhle verabreicht. Die Konzentration des hydrolysierten Glucans in der Salzlösung betrug 0,1 % (Gewicht/Volumen). 25 Tage nach dem Aufpfropfen wurde der Durchmesser des Tumors gemessen. Der Versuch wurde unter Verwendung einer Kontrollgruppe von Mäusen wiederholt, denen kein hydrolysiertes Glucan verabreicht wurde. Das Tumordurchmesser-Hemmungsverhältnis (%) wurde mit Hilfe der nachstehenden Formel errechnet:

$$\frac{d_0 - d}{d_0} \times 100$$

worin d_0 der durchschnittliche Tumordurchmesser (mm) der

130049/0102

Kontrollgruppe und d der durchschnittliche Tumordurchmesser der behandelten Gruppe ist. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 1 aufgeführt, die die Wirkung von variierenden Mengen des pro Tag verabreichten erfindungsgemäßen hydrolysierten Glucans auf das Tumor-Hemmungsverhältnis zeigt.

45 Tage nach dem Aufpfropfen wurden alle behandelten Mäuse sorgfältig untersucht, um die Anzahl von Mäusen zu bestimmen, die eine vollständige Regression des Tumors zeigten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind ebenfalls in Tabelle 1 gezeigt, in der die Anzahl von Mäusen, die vollständige Regression zeigten, im Verhältnis zu der Gesamtzahl der untersuchten Mäuse in der jeweiligen Gruppe angegeben ist.

Tabelle 1

Verabreichte Menge (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Tumor-Hemmungs- Verhältnis (%)	Vollständige Regression
0,1	47	1/5
1,0	85	3/4
10,0	100	5/5

(2) Arthritishemmende Aktivität

Diese Versuche wurden nach der Verfahrensweise nach Winder et al (C.V. Winder, L.A. Lembke und M.D. Stephens, Arth. Rheum., 12, 472 (1969)) zur Messung der Fähigkeit von Verbindungen zur Unterdrückung von Adjuvans-induzierter Arthritis von Ratten durchgeführt. Dieser Versuch wird üblicherweise zur Prüfung von anti-neoplastischen Mitteln angewendet.

130049/0102

Lewis-Ratten erhielten eine subcutane Injektion des Adjuvans in die Sohlenfläche jeder rechten Hinterpfote, um die Krankheit hervorzurufen. Eine Lösung des erfindungsgemäßen hydrolysierten Glucans wurde nach dem Einimpfen des Adjuvans 15 Tage lang täglich in die Bauchhöhle injiziert. Die Versuche wurden mit einer Kontrollgruppe von Tieren wiederholt, denen das hydrolysierte Glucan nicht verabreicht wurde. Am 18., 20., 24., 28. und 32. Tag nach dem Einimpfen des Adjuvans wurden die Schwellungen der Füße der behandelten Ratten mit den Schwellungen der Füße der nicht behandelten Ratten verglichen und unter Anwendung einer ähnlichen Formel wie der zur Errechnung des Tumor-Hemmungs-Verhältnisses verwendeten Formel wurde das Hemmungsverhältnis für jede Dosis des hydrolysierten Glucans berechnet. Die Ergebnisse sind in Form der Mittelwerte in der nachstehenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Verabreichte Menge (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Zahl der Tiere	Hemmungs- Verhältnis	ID ₅₀
0,1	5	36,8 \pm 3,6	0,33
1,0	10	59,0 \pm 3,9	

(3) Akute Toxizität

Ein Test der akuten Toxizität (Beobachtung während einer Woche) wurde durchgeführt, indem Proben des hydrolysierten Glucans in die Bauchhöhle von männlichen ddy-Mäusen injiziert wurden. Nach der Verabreichung der Proben in Mengen von 100 bzw. 300 mg/kg wurden keine Todesfälle beobachtet und das Körpergewicht stieg normal an.

130049/0102

Aus den vorstehend erläuterten Ergebnissen ist ersichtlich, daß das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan beträchtlichen Wert als immunmodulierendes Mittel hat. Die Verabreichung des Mittels erfolgt vorzugsweise parenteral, beispielsweise durch subcutane Injektion, intravenöse Injektion oder intramuskuläre Injektion.

Die Tagesdosis schwankt in Abhängigkeit von der zu behandelnden Krankheit, dem Verabreichungsweg und der Häufigkeit der Verabreichung; im allgemeinen beträgt jedoch die Tagesdosis für einen Erwachsenen 0,5 bis 50 mg, beispielsweise etwa 5 mg. Diese Menge kann als Einzeldosis oder in Teildosen verabreicht werden.

Das erfindungsgemäße hydrolysierte Glucan kann in einer Form zubereitet werden, die für den gewählten Verabreichungsweg geeignet ist, wobei jede beliebige der Zubereitungen angewendet werden kann, die normalerweise für andere immunmodulierend wirksame Mittel angewendet wird. So kann beispielsweise ein Mittel in einer Ampulle in der Menge einer Dosisseinheit vorgesehen werden oder es kann in einem Behälter für mehrere Dosisseinheiten, vorzugsweise zusammen mit einer antiseptisch wirksamen Substanz, vorgesehen werden.

Das Mittel kann in Form einer Suspension, einer Lösung oder einer Emulsion in einem öligen oder wässrigen Trägermedium angewendet werden und kann gegebenenfalls übliche Zusätze, beispielsweise Suspensionshilfsmittel und/oder Stabilisatoren und/oder Dispergiermittel enthalten.

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann die aktive Substanz in Form eines Pulvers vorliegen, welches vor der Verabreichung in einem geeigneten Träger, beispielsweise in sterilem, pyrogenfreiem Wasser, gelöst wird.

Wenn das erfindungsgemäße Mittel in Form einer Dosisseinheit vorgesehen wird, enthält es vorzugsweise 0,5 bis 10 mg der aktiven Substanz pro Dosisseinheit.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele ausführlicher erläutert. Darin zeigt Beispiel 1 die Herstellung des er-

130049/0102

findungsgemäßen hydrolysierten Glucans und Beispiel 2 die Herstellung eines pharmazeutischen Mittels, welches das hydrolysierte Glucan enthält.

Beispiel 1

Zu 3 g Corticane (einem Polysaccharid, das gemäß dem nachfolgenden Herstellungsbeispiel erhalten wurde) wurden 240 ml einer 90-prozentigen (Gewicht/Gewicht) wässrigen Ameisensäure gegeben und das Gemisch wurde unter Rühren 20 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach dem Verdampfen der Ameisensäure unter vermindertem Druck wurden 600 ml Wasser zu dem Rückstand zugefügt und das gebildete wässrige Gemisch wurde unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde dann 15 Minuten lang bei 10 000 Upm zentrifugiert. Zu der so abgetrennten überstehenden Flüssigkeit wurden 2,4 l Äthanol gegeben, wobei ein Niederschlag gebildet wurde, der dann durch Zentrifugieren gewonnen wurde. Zu dem Niederschlag wurden 500 ml Wasser gegeben und dann wurde das wässrige Gemisch gefriergetrocknet, wobei 2,0 g des gewünschten hydrolysierten Glucans in Form eines weißen amorphen Feststoffes erhalten wurden. Das Produkt hatte folgende Eigenschaften:

Elementaranalyse

Berechnet für $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot nH_2O$:

C: 40,00 %; H: 6,71 %; Wasser: 10,00 %.

Gefunden: C: 40,22 %; H: 6,52 %; Wasser: 9,63 %.

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ (c = 0,1, Dimethylsulfoxid).

Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr) ν_{cm}^{-1} :

3400, 1640, 1080, 1040.

130049/0102

Molekulargewicht (analytische Ultrazentrifugalverteilung,
Phosphatpuffer, pH 6,5): 159 000.

Beispiel 2

5 mg des in Beispiel 1 erhaltenen hydrolysierten Glucans wurden in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und die Lösung wurde dann in üblicher Weise durch Erhitzen sterilisiert, wobei eine injizierbare Lösung erhalten wurde.

Herstellung des Ausgangs-Glucans

In fünf 500 ml-Sakaguchi-Kolben wurden jeweils 100 ml eines Glucose-Kartoffelmediums (mit einem Gehalt an 2 Gew.-% Glucose in einer gekochten Brühe, die 200 g/l Kartoffeln enthielt) gegeben und der Kolbeninhalt wurde sterilisiert. Eine Kultur von *Corticium vagum* F-31-9 (FERM No. 302) wurde dann eingepflegt und die Schüttelkultur wurde 8 Tage lang bei 26°C durchgeführt. Nach der Beendigung der Züchtung wurden 800 ml destilliertes Wasser zu 400 ml der Kulturbrühe gegeben und der pH-Wert des Gemisches wurde auf 7,4 eingestellt. Das Gemisch wurde dann in einer Homogenisiervorrichtung homogenisiert und die feste Substanz wurde durch Zentrifugalabscheidung entfernt.

Zu 1 l der überstehenden Flüssigkeit wurden 3 l Äthanol gegeben und der gebildete Niederschlag wurde durch Zentrifugieren gewonnen und in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 162 ml einer 0,1 m wässrigen Lösung von Cetyltrimethylammoniumbromid und 13 ml einer 0,5 m wässrigen Lösung von Natriumhydroxid zugesetzt, um den pH-Wert der Lösung auf 12,6 einzustellen, so daß die Polysaccharide ausgefällt wurden. 300 ml einer 10 %igen (Gewicht/Volumen) wässrigen Essigsäure wurden zu dem Niederschlag gegeben, um ihn zu lösen, wonach der Lösung 1,2 l Äthanol zugesetzt wurden. Der gebildete Niederschlag wurde in 350 ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung wurde in einen Celluloseschlauch gefüllt und gegen destilliertes Wasser

130049/0102

dialysiert. Zu 500 ml des Dialysats wurden 2 l Äthanol gegeben, um erneut die Polysaccharide auszufällen. Der gebildete Niederschlag wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und dann gefriergetrocknet, wobei 2 g eines rohen Glucans erhalten wurden.

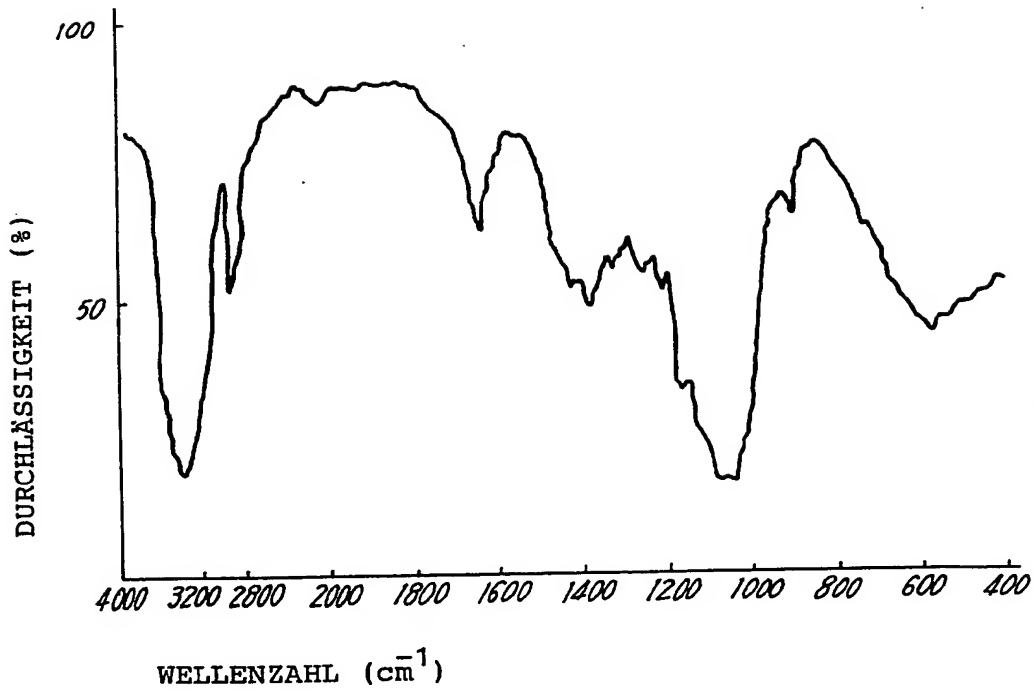
13,5 mg des so erhaltenen rohen Glucans wurden in 27 ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung wurde durch eine mit Sephadex G-200 (Warenzeichen) gefüllte Säule geleitet. Die Säule wurde dann mit destilliertem Wasser eluiert und das Eluat in 20 ml-Fractionen gewonnen. Das Glucan zeigte einen Peak in der dritten Fraktion und in den Fraktionen 2 bis einschließlich 11 wurden 75,3 % des gesamten Polysaccharids gewonnen. Die Fraktionen 2 bis 11 wurden kombiniert und der erhaltenen Lösung wurden 800 ml Äthanol zugesetzt, um die Ausfällung durchzuführen. Der erhaltene Niederschlag wurde in destilliertem Wasser gelöst und dann gefriergetrocknet, wobei 9,2 mg eines als "Corticane" bezeichneten Glucans erhalten wurden. Corticane ist eine weiße neutrale Substanz.

130049/0102

- 16 -
Leerseite

-17-
3019614

Nummer:	30 19 614
Int. Cl. ³ :	C 08 B 37/00
Anmeldetag:	22. Mai 1980
Offenlegungstag:	3. Dezember 1981



130049/0102